

## PATENT ABSTRACTS OF JAPAN

(11)Publication number : 2000-053668

(43)Date of publication of application : 22.02.2000

(51)Int.Cl. C07D305/14  
// C07B 63/00

(21)Application number : 10-227175

(71)Applicant : JUMOKU SEIRI KINOSEI  
BUSSHITSU GIJUTSU KENKYU  
KUMIAI

(22)Date of filing : 11.08.1998

(72)Inventor : KATO CHUZO  
KURODA KAZUYUKI  
MATSUMOTO SHIGEAKI  
KUBOTA MINORU

### (54) PURIFICATION OF TAXANE COMPOUND-INCLUDING COMPOSITION

#### (57)Abstract:

**PROBLEM TO BE SOLVED:** To provide a purifying method in which purifying procedure is simplified and the loss of taxane compound on purifying is reduced for the purpose of efficiently obtaining a taxane compound-including ingredient and to provide a convenient method for purifying cephalomanine.

**SOLUTION:** This method for purifying taxane compounds-including ingredients is to adsorb taxane compounds-including ingredients with a porous material having 25-120  $\text{\AA}$ ; minute hole diameter from a mixture including at least one kind of taxanes and then to elute the ingredients. This method for purifying cephalomanine is to adsorb cephalomanine with a porous material having 25-120  $\text{\AA}$ ; minute hole diameter from a mixture including cephalomanine and then to elute cephalomanine with an aqueous methanol solution including 30-40 wt.% methanol.

\* NOTICES \*

JPO and INPIT are not responsible for any damages caused by the use of this translation.

- 1.This document has been translated by computer. So the translation may not reflect the original precisely.
- 2.\*\*\* shows the word which can not be translated.
- 3.In the drawings, any words are not translated.

CLAIMS

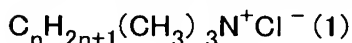
[Claim(s)]

[Claim 1] 10-deacetyl baccatine III, the baccatine III, and cephalomanin, From a mixture containing one or more sorts of taxane compounds chosen from a group which consists of 7-beta-xylotaxol, 10-deacetyl taxol, and a taxinine. A refining method of a taxane compound component, wherein a pole diameter adsorbs an ingredient which contains this taxane compound using foam which is 25-120A and makes it eluted as adsorbent.

[Claim 2] The refining method according to claim 1 whose foam is silica gel.

[Claim 3] The refining method according to claim 2 whose silica gel is meso-porous silica gel or meso pore silica gel.

[Claim 4] Meso-porous silica gel is a money dynamite and a general formula (1).



(however, n is 12-18.) -- the refining method according to claim 3 which is what is produced by making alkyl trimethylammonium chloride shown react.

[Claim 5] A refining method of any of a certain Claims 1-4 or a description with an extract of vegetable origin of a mixture containing a taxane compound.

[Claim 6] The refining method according to claim 5 whose vegetation is vegetation of Taxaceae.

[Claim 7] one of Claims 1-6 which makes a taxane compound component which stuck to adsorbent eluted using mixed liquor of a water soluble organic solvent and water as a solvent -- a refining method of a description.

[Claim 8] A refining method of a taxane compound which establishes a purification process which refines further a taxane compound component refined by any of Claims 1-7, or a method of a description, and isolates a taxane compound.

[Claim 9] A refining method of cephalomanin which adsorbs cephalomanin using foam whose pole diameter is 25-120A, and is characterized by ranking second and making it eluted with a methanol aqueous solution whose methanol concentration is 30 to 40 % of the weight as adsorbent from a mixture containing cephalomanin.

[Translation done.]

**\* NOTICES \***

JPO and INPIT are not responsible for any damages caused by the use of this translation.

- 1.This document has been translated by computer. So the translation may not reflect the original precisely.
- 2.\*\*\*\* shows the word which can not be translated.
- 3.In the drawings, any words are not translated.

**DETAILED DESCRIPTION**

[Detailed Description of the Invention]

[0001]

[Field of the Invention]This invention relates to the refining method of a taxane compound component. In detail, a taxane compound component is refined using adsorbent, and it dissociates from the vegetation or this plant extract of the mixture containing taxane compounds, such as 10-deacetyl baccatine III, especially Taxaceae still more nearly selectively, and is related with the method of refining.

[0002]

[Description of the Prior Art]A taxane compound is a diterpene compound in which use in a medicine field is achieved, and can be used as medicine or a raw material of drugs. As this taxane compound, 10-deacetyl baccatine III, the baccatine III, cephalomanin, 7-beta-xylo sill taxol, 10-deacetyl taxol, a taxinine, etc. are mentioned, for example.

[0003]Although production of taxol and a taxane compound is considered by the Organic Chemistry Division synthetic method, inefficient (Nature, 367, and 630 (1994).) for industrializing with the Organic Chemistry Division synthetic method at present, since there are many processes as 40 to 50 process and yield is also low J. Am. Chem. Soc., 116, 1597, 1599 (1994), Kuwajima : lecture proceedings S3 page (1997) about the 41st perfume, a terpene, and oil-refinement chemicals, etc.

[0004]The method of obtaining taxol and a taxane compound comparatively [ now ] easily is the method of carrying out solvent extraction from the branches and leaves of the Taxaceae trees. The taxol currently sold in the present world is led to taxol by a semisynthesis from 10-deacetyl baccatine III which is a catalyst precursor of the thing refined by carrying out solvent extraction from the Taxaceae trees, or the taxol similarly contained in the Taxaceae trees.

[0005]As extraction from the Taxaceae trees, and a refining method, methods, such as column chromatography, liquid chromatography, and recrystallization, are mainly reported. For example, the method (JP,H5-202016,A) of Pharmaceutical Research, Vol. 12, No. 12, 1003 (1995), JP,H8-127574,A, and other supercritical extraction, etc. are mentioned.

[0006]However, the consistency substance etc. which are called 50 or more kinds of low-molecular compounds, lignin and a lignin sugar compound, and tar are contained in the extract from the Taxaceae trees. Separation is difficult in order that a bulking agent may cause blinding by tar, lignin, etc. in the way column chromatography separates a taxane compound. If neither tar nor lignin is removed thoroughly, the expensive column of the preparative isolation liquid chromatograph device used in the second half of refining will become dirty, and the life of a column will become short. Therefore, it is necessary to remove a lot of tar, lignin, etc., and very complicated operation is performed for removal.

[0007]Even if it obtained the extract using the solvent which can dissolve neither lignin nor tar easily as an extracting solvent, when a solvent with low polarity is used, the extraction efficiency of a taxane compound is bad. And there is no change in the low molecular weight compound of various sorts other than a taxane compound being contained in this extract, and it leaves SUBJECT to the efficiency of refining, and operativity.

[0008]In these operations, the problem of deteriorating in process of operation, or a column etc.

being adsorbed and not coming out that it adsorbs dispersedly into a bulking agent during separation of a tar, lignin, etc. since the taxane compound is contained only in the minute amount, and only small quantity can be collected is mentioned.

[0009]Although a tar and lignin are hard to be extracted by the method of the supercritical extraction by CO<sub>2</sub> gas, The recovery rate from the plant body of a taxane compound is low compared with methanol extraction etc., and it having to carry out with high voltage and the problem that the device of large-sized industrial use supercritical extraction is very expensive are mentioned.

[0010]Although taxol and a taxane compound are a very expensive reagent or drugs, the quantity of these compounds contained in trees is in the situation where it is as few as several 10 – 100 ppm of numbers, and insufficient for medicating the cancer patient whom the world increases. Therefore, the economical loss by the loss at the time of refining is large.

[0011]At the time of refining of a taxane compound, cephalomanin remained as an impurity, and even if it used preparative liquid chromatography, it was not easily separated from other taxane compounds. As a conventional separation method, an ozonate reaction is performed into the mixture of a taxane compound at -70 \*\*, The method (K. V. Rao et al., Pharmaceutical Research, Vol. 12, and 1003) or (1995) bromine which uses cephalomanin as the derivative which it oxidizes and is easy to separate is made to react to a mixture, The method (J. M. Rimoldi et al., J. Nat. Prod., Vol. 59, and 167-168 (1996)) of using as the derivative which brominates cephalomanin and is easy to separate is known. However, it is complicated to carry out ozonate at -70 \*\*, if it becomes a large-sized device. Since the side reaction to which other taxane compounds vary with bromine at a bromination reaction occurs, there is a problem that control of a reaction is difficult.

[0012]

[Problem(s) to be Solved by the Invention]In order that the purpose of this invention may obtain a taxane compound component efficiently, it simplifies refining operation and there is in providing the refining method which suppressed the loss of the taxane compound at the time of refining further. Furthermore, the purpose of this invention is to provide the simple refining method of cephalomanin.

[0013]

[Means for Solving the Problem]Namely, a gist of this invention, [1]10-deacetyl baccatine III, the baccatine III, and cephalomanin, From a mixture containing one or more sorts of taxane compounds chosen from a group which consists of 7-beta-xylo sill taxol, 10-deacetyl taxol, and a taxinine. A refining method of a taxane compound component, wherein a pole diameter adsorbs an ingredient which contains this taxane compound using foam which is 25-120A and makes it eluted as adsorbent, [2]Above[1]A refining method of a taxane compound which establishes a purification process which refines further a taxane compound component refined by a method of a description, and isolates a taxane compound, [3]As adsorbent, using foam which is 25-120A, a pole diameter adsorbs cephalomanin and ranks second from a mixture containing cephalomanin, It is related without a refining method of cephalomanin making it eluted with a methanol aqueous solution whose methanol concentration is 30 to 40 % of the weight.

[0014]

[Embodiment of the Invention]A pole diameter adsorbs a taxane compound component and makes the refining method of the taxane compound component of this invention eluted from the mixture containing a taxane compound using the foam which is 25-120A as adsorbent.

[0015]In this Description, with a "taxane compound component." The mixed ingredient of one or more sorts of taxane compounds chosen from the group which consists of 10-deacetyl baccatine III, the baccatine III, 7-beta-xylo sill taxol, 10-deacetyl taxol, cephalomanin, and a taxinine is said.

[0016]The refining method of this invention can roughly be divided into the following process.

- 1) The process which makes the mixture containing a taxane compound stick to foam.
- 2) The process which makes a taxane compound component eluted from the foam to which the taxane compound component was made to stick.

Hereafter, this invention is explained for every process.

[0017]1) As a mixture containing the taxane compound used in the method of process this invention of making the mixture containing a taxane compound sticking to foam, The mixture etc. which are obtained by not the thing that will be limited especially if a taxane compound is contained but the partially purified substance which refined selectively vegetation or the extract of vegetable origin, and this extract by the publicly known method, for example, and chemosynthesis and containing a by-product etc. are mentioned. Although what ground a vegetable leaf, a bark, a root, a twig, a seed, all the seedlings, etc. may be used in this invention as a mixture which contains a taxane compound as it is, It is more desirable to use the extract etc. which are extracted from the leaf of the above vegetation, etc. as a mixture containing a taxane compound in terms of the increase in efficiency of refining.

[0018]Alkaline solution and/or acid solution may wash the mixture containing a taxane compound if needed. Since carboxylic acid, alkaloid, etc. are effectively removable by such washing operation, it is desirable. This washing operation can adopt the operation generally performed in the field of Organic Chemistry Division.

[0019]Especially if a taxane compound is contained as this vegetation, it is not limited, but since a taxane compound is included comparatively so much, the vegetation of Taxaceae, etc. are mentioned, for example. As vegetation of Taxaceae, the vegetation of a TAKUSASU group is preferred and specifically T. BUREBIHORIA (brevifolia), T. BAKKATA (baccata), T. media (media), T. WARICHIANA (wallichiana), T. kana DENJISU (canadensis), T. KASUPI data (cuspidata), T. SUMATORANA (sumatorana), etc. are mentioned.

[0020]The method in particular of extracting the mixture containing a taxane compound from this vegetation is not limited, and can use publicly known methods, such as a solvent extraction method. Especially if it is a method usually used as a method of extracting with a solvent, it is not limited, but for example, the portion containing taxane compounds, such as the leaf of the above-mentioned vegetation, a bark, a root, a twig, a seed, and all the seedlings, is ground, and the method of extracting with a solvent is mentioned. Especially if a taxane compound can be dissolved as a solvent used for extraction, it is not limited, but methanol, ethanol, chloroform, dichloromethane, methyl acetate, ethyl acetate, acetone, etc. are mentioned. This solvent may be used independently, may mix two or more sorts and may be used. Thus, the extract obtained may contain ingredients, such as not only a taxane compound but lignin, tar, etc.

[0021]It will not be limited especially if a pole diameter is foam which is 25-120A as adsorbent used for this invention.

[0022]As foam, that whose pole diameter is 25-60A is preferred, and is 30-40A especially preferably 30-50 A more preferably. 120A or less is preferred from a viewpoint of the selectivity of an ingredient of not less than 25A being preferred, and adsorbing from a viewpoint of the ease of entering to the fine pores of the molecule of a taxane compound.

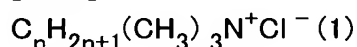
[0023]Conventionally, since it is large compared with other foam daily used as adsorbent, in this invention, the pole diameter of the above-mentioned range can catch the taxane compound which has a molecular diameter of the grade which is not adsorbed in the fine pores of the foam used for this invention with usual foam.

[0024]Especially if it has the capability to adsorb a taxane compound and to make it eluted as construction material of foam, it is not limited, but desirable minerals porous silica gel is good.

[0025]Especially if a taxane compound is adsorbed and may be made eluted as silica gel, it is not limited, but meso-porous silica gel, meso pore silica gel, etc. which have a desired pole diameter are preferred. The width of distribution of the direction of the meso-porous silica gel which succeeded in composition especially as a result of this invention persons wholeheartedly research of a pole diameter is more preferred from a narrow thing.

[0026]As a synthesizing method of the meso-porous silica gel used for this invention, they are a money dynamite ( $\text{NaHSi}_2\text{O}_5$  and  $3\text{H}_2\text{O}$ ) and a general formula (1), for example.

[0027]



[0028]The method of coming out, making the alkyl trimethylammonium chloride shown react, and

compounding is mentioned (T. Yanagisawa, T. Shimizu, K. Kuroda, C. Kato, Bull. Chem. Soc. Jpn., 63,988 (1990)).

[0029] In the alkyl trimethylammonium chloride shown by a general formula (1) although not limited especially as alkyl trimethylammonium chloride used for composition of meso-porous silica gel, that the ranges of whose  $n$  are 12-18 is preferred -- more -- desirable -- 14-18 -- it is 16-18 especially preferably. Since a pole diameter will become small if the carbon number of an alkyl group is small, if 12 or more are preferred as for the viewpoint of the ease of entering to the fine pores of a taxane compound to a carbon number and the carbon number of an alkyl group is too large, in order that a pole diameter may be too large and other compounds may enter, As for a carbon number, since what has a with a carbon numbers [ the viewpoint of maintenance of selectivity to ] of 18 or more alkyl group is hard to come to hand, 18 or less are preferred.

[0030] the case where  $n$  prepares meso-porous silica gel using the compound of 12-18 in a general formula (1) -- the meso-porous silica gel -- a pole diameter -- about 20 -- the swage block which is about 40A -- the specific surface area value which has many holes of \*\* is a thing of  $900 - 1200 \text{ m}^2/\text{g}$ .

[0031] It is a porous silica gel system material in which distribution of a pole diameter is larger than meso-porous silica gel, and, as for meso pore silica gel, what has various pole diameters is marketed. For example, although there are some which have a pole diameter of the wide range whose pole diameter is 10-80A in KASEIGERU (made in Tokyo Chemicals), there are few fine pores than meso-porous silica gel, therefore a specific surface area value is as smaller as  $250 - 500 \text{ m}^2/\text{g}$ . Die saw gel (made by DAISO Co., Ltd.) is also meso pore silica gel which has pole diameter [ of about 60 A ], and specific surface area [ of about  $500 \text{ m}^2/\text{g}$  ].

[0032] Especially the former is what succeeded in composition of what has a desired pole diameter as a result of this invention persons' wholeheartedly research also in the above-mentioned meso-porous silica gel or meso pore silica gel, The taxane compound with a large molecular diameter to which it cannot stick in usual foam can be caught in the fine pores in this gel.

[0033] As a method of refining a taxane compound component, especially if the above-mentioned adsorbent is used, it will not be limited.

[0034] The amount in particular of the foam used used for this invention is not limited, and can be freely adjusted with the content of the taxane compound component contained in a mixture. The quantity of an about [ 1/100 to 50 of the concentrate weight of the mixture containing a taxane compound times ] is specifically preferred, and they are 1/10 to 10 times especially preferably 1/20 to 20 times more preferably.

[0035] Here, the "concentrate" of the mixture containing a taxane compound is obtained by water bath temperature condensing the mixture containing a taxane compound using an evaporator at 35-40 \*\*.

[0036] As a solvent used at the time of adsorption to the foam used for this invention, It is not limited especially if most mixtures which polarity is smaller than the solvent for elution, and contain a taxane compound may be dissolved, and dichloromethane, toluene, benzene, chloroform, etc. are mentioned, for example. These may be used independently, and may be mixed and used.

[0037] When the solvent used when a taxane compound was extracted from vegetation can use also as a solvent used at the time of adsorption, an extract may be contacted to foam as it is. What is necessary is just to add a suitable adsorption solvent, after removing a solvent from an extract when the solvent at the time of extraction cannot use as a solvent at the time of adsorption.

[0038] Although not limited in particular for the amount of the adsorption solvent used, about 3 to 1000 times of the weight of the concentrate of the mixture containing a taxane compound are preferred, and is five to 50 times especially preferably five to 800 times more preferably.

[0039] It is not limited especially as a method of making a taxane compound component sticking to the foam which has a predetermined pole diameter. For example, the foam used for this

invention and the mixture containing a taxane compound are made to stir together suitable time, or a column is filled up with the foam used by this invention, and the mode etc. which carry out load of this mixture to a column are mentioned.

[0040] Thus, the compound (a taxane compound is contained.) whose molecular weight is 450 to about 1000 sticks to the compound which has polarity in the hole of foam, and polarity with a degree in the middle by contacting the mixture and foam containing a taxane compound. The same solvent as the solvent used at the time of adsorption flushes and removes the compound which was not adsorbed.

[0041] This foam may be washed before making a taxane compound component eluted from the foam to which the taxane compound component stuck. As a solvent used for washing, water is mentioned as a suitable thing. If water is added to the foam to which the taxane compound component stuck, many of polar compounds other than a taxane compound component will be eluted. Then, if eluted with 30 to 40% of the weight of a methanol aqueous solution, cephalomanin and 10-deacetyl baccatine III begin to melt into a penetrant remover selectively among taxane compounds, and it can separate from other ingredients. That is, cephalomanin can be efficiently refined by being eluted by the methanol water-soluble matter of this concentration. As for the concentration of a methanol aqueous solution, 35 to 40 % of the weight is more preferred. When refining cephalomanin, as a mixture containing cephalomanin, the mixture containing the above-mentioned taxane compound is mentioned.

[0042] 2) As a solvent used for elution of the process taxane compound component which makes a taxane compound component eluted from the foam to which the taxane compound component was made to stick, The mixed liquor of not the thing that will be limited especially if suitable for elution of a taxane compound component but a water soluble organic solvent, and water is mentioned. Methanol, ethanol, acetonitrile, acetone, etc. are mentioned as a water soluble organic solvent. The amount of organic solvents in particular in mixed liquor is not limited. It is preferred to use it according to the characteristic of an adsorption material, changing the mixture ratio of water and an organic solvent.

[0043] Although not limited in particular for the amount of the elution solvent used, about 2 to 1000 times of the weight of the concentrate of the mixture containing a taxane compound are preferred, and is ten to 500 times especially preferably five to 800 times more preferably.

[0044] What is necessary is just to contact the solvent and foam which are used for elution of a taxane compound component as a method of making it desorb from the foam to which the taxane compound component stuck by making a taxane compound component eluted. Foam and this solvent are made to stir together suitable time, or, specifically, the mode etc. which fill up a column with foam and pour this solvent in the column are mentioned.

[0045] Thus, by contacting the above-mentioned elution solvent to foam, most taxane compound components are eluted and it is desorbed.

[0046] Thus, the refining method of this invention can be compared with the conventional method, and can separate and refine a taxane compound component selectively effectively by very easy operation.

[0047] In the adsorbent using the die saw gel (67A of average pore sizes) which is meso pore silica gel, after adsorption, if water and a 35-% of the weight methanol aqueous solution wash adsorbent, it will be preferentially eluted in cephalomanin and 10-deacetyl baccatine III among the adsorbed taxane compounds. Then, adsorbent can be processed with methanol and other taxane compounds can be made eluted. Thus, since the solubility of each compound to an eluate differs even if it calls it a taxane compound, each taxane compound is effectively separable using the point. As for the state of elution also with each compound of a taxane compound, some differences are accepted also with the kind of adsorbent, or the size of a pore diameter.

[0048] According to the method of this invention, adsorption with this porous silica gel and washing can also dissociate and refine cephalomanin from taxol etc. comparatively easily. Meso pore silica gel is adsorbed, and by having removed a tar, lignin, etc., the taxane compound in which it was eluted by the methanol eluate serves as several times before adsorption as much content, is refined more by the altitude, and isolates easily by the following purification process.

[0049] By solvents', such as methanol's and acetone's, washing foam after being eluted in the

taxane compound component, and removing lignin, tar, etc. from foam and subsequently washing with solvents, such as dichloromethane and toluene, The foam after washing obtained is recyclable for adsorption of a taxane compound component, and elution.

[0050]3) The purification process which refines further the taxane compound component refined by the purification process pan by the above-mentioned method in this invention, and isolates a taxane compound may be established. By establishing this process, a taxane compound can be refined more to a high grade, and it becomes possible to isolate each compound. The taxane compound component especially obtained by the above methods of adsorbing a taxane compound component and making specific foam eluted, Since the ingredients (lignin, tar, etc.) which make difficult refining operation by column chromatography, high performance chromatography (HPLC), etc. are removed effectively, this refining operation is easily combinable. Therefore, it can perform simply carrying out isolation refining of the taxane compound more at an altitude.

[0051]The method used for the refining method of organic compounds, such as a taxane compound more publicly known than before, as a refining means which can be used by a purification process is mentioned. For example, methods, such as high performance chromatography (HPLC), supercritical fluid chromatography, and recrystallization, are mentioned. Gel filtration chromatography, column chromatography, etc. using sephadex LH-20 (trade name) etc. can be used. These methods may be enforced independently and may be performed combining two or more sorts of methods. When refining combining two or more sorts of methods, before refining by HPLC, it is more preferred to enforce other refining methods. The life of the bulking agent of HPLC can be lengthened by this.

[0052]By the above-mentioned method, isolation refining can be carried out about 10-deacetyl baccatine III, the baccatine III, 7-beta-xylo sill taxol, 10-deacetyl taxol, cephalomanin, a taxinine, etc.

[0053]

[Example]Hereafter, although working example and a comparative example explain this invention in more detail, this invention is not limited at all by this working example.

[0054]100 kg (a twig 5 mm or less in diameter is included.) of preparation yew green leaves of the working example 1 yew leaf extract were ground using the grinder:large 300TC type (product made from TANINAKA), and the grinding thing (1 mm x about 2 mm) was obtained. This grinding thing was fed into the stainless steel container (with the valve for draining 200 - 400L \*\* and an extract from a bottom) which stretched the wire gauze of 100mesh at the pars basilaris ossis occipitalis. It dipped for two days by the hexane 150L, a part for the low of a leaf was dissolved, and hexane was extracted. Then, the methanol 150L was put in, and it dipped for four days at 20-25 \*\*, sometimes stirring. The extract by methanol was taken out from the bottom of the stainless steel container. The penetrant remover produced by washing the residue which remained in the container with the methanol 100L was added to the above-mentioned methanol extract. This methanol extract was condensed by the large-sized evaporator with a water temperature of 35-40 \*\*, and the mixed liquor 21L of water and an oil was obtained. This mixed liquor was put into the iron pot with the agitator of 100L \*\*, the methyl acetate 20L and the saturation salt cake water 10L were added further, and it stirred for 20 minutes. The successor was settled and separation removal of the water layer was carried out from the iron pot. The saturation salt cake water 10L was again added to the oil reservoir which remained, after washing, the water layer and the oil reservoir were separated again and the oil reservoir of 15L was obtained.

[0055]The oil reservoir of 15L was condensed and the mixed dark green oil 3050g in which the ingredient of a large number including a taxane compound, a tar, lignin, etc. is contained was obtained. This mixed dark green oil was used as the yew leaf extract.

[0056]Analysis of taxane compounds, such as a yew leaf extract and an extract obtained by each purification process, and a fixed quantity were performed by the high-speed liquid chromatograph (abbreviated to HPLC). A device is Shimadzu LC-10A and a column is product Pegasil Cmade from Seng Shue science8 column (4.6 mm in diameter.). 25 cm in length, UV detector wavelength of 227 nm, eluate:acetonitrile / 10mM ammonium acetate solution = it analyzed on condition of



for 45/55 (volume ratio) and rate-of-flow 0.6mL/. The analytical curve of UV absorption intensity is beforehand prepared using the preparation, and a fixed quantity of the ingredient was performed using the analytical curve. The content of each ingredient in a yew leaf extract (3050g). They were 10-deacetyl baccatine III 2.71g, baccatine III 0.28g, 2.54 g of 7-xylol taxol, 0.24 g of cephalomanin, 10-deacetyl taxol 0.11g, and 4.13g of taxinines.

[0057]It is preferred for the washing yew leaf extract of the yew leaf extract to contain carboxylic acid, alkaloid, etc., and to remove this beforehand. The sodium hydroxide half saturation salt cake water 7L was added to the yew leaf extract 15L 5%, and it stirred for 10 minutes at 200-300 rpm. The water layer was removed after settlement for 20 minutes. This operation was performed once again. Next, in addition to the yew leaf extract which is an oil reservoir about the methyl acetate 10L, the methanol aqueous solution 7L was added 5 more% chloride-5%, and it washed twice by the same method as the above. The oil reservoir after separation was washed with 1 / 10 saturated sodium bicarbonate water-saturation salt cake water 10L (volume ratio), subsequently vacuum concentration of the oil reservoir of a penetrant remover was carried out by 35-40 \*\* of solution temperature, and the black oil 974g was obtained. 10-deacetyl baccatine III 2.27 g (83.9% of recovery rate), 0.24 g (86% of recovery rate) and 7-xylol taxol the baccatine III 2.34 g (92.1% of recovery rate), As for 0.095 g (86.4% of recovery rate), and a taxinine, as for 0.22 g (91.1% of recovery rate), and 10-deacetyl taxol, 3.59 g (86.9% of recovery rate) was contained [ cephalomanin ] in the black oil.

[0058]The synthetic high-purity-water glass of mesoporous silica (FSM-C16) and 2N sodium hydroxide solution were stirred for one day after adjustment so that it might be set to  $\text{SiO}_2/\text{Na}_2\text{O}=2.0$ . It was calcinated under an air atmosphere for 750 \*\* and 1 hour, and  $\delta\text{-Na}_2\text{Si}_2\text{O}_5$  was obtained. The water 1L was made to distribute obtained 50-g  $\delta\text{-Na}_2\text{Si}_2\text{O}_5$ , stirring was performed for 30 minutes, and the money dynamite of slurry form was obtained. The hexadecyl trimethylammonium chloride solution of 0.1 mol / L was made to distribute the money dynamite of the slurry form, and stirring was performed at 70 \*\* for 3 hours. Supernatant liquid was removed by centrifugal separation after that, and water was made to distribute precipitation. Subsequently, 2N chloride performed centrifugal separation after adjusting the pH to 8.5, and precipitation was obtained. Washing according precipitation to air-drying and water was performed. When the obtained granular material was put into the electric furnace and calcination of 3 hours was performed at 700 \*\*, 45 g of meso-porous silica gel (abbreviation FSM-C16) was obtained. XRD analysis and nitrogen absorption measurement performed the check of composition of mesoporous silica.

[0059]For XRD analysis, an X-ray generator (1.54050A of line sources (Cu), 3kw), The monochromator (tube voltage of 40 kV, 30 mA of tube current) was used, and it analyzed on the conditions of sampling width 0.01deg, scan speed 2 deg/min, divergent slit 1deg, scattering slit 1deg, and 0.15 mm of light-receiving slits. By such XRD analysis, it was checked that it is silica gel of the honeycomb structure of a uniform and big pole diameter.

[0060]Nitrogen absorption measurement used the BERSORP28SA molding equipment made from Japanese Bell. After drying a sample on  $10^{-2}$ Torr and 40 \*\* conditions for 6 hours, it carried out by 196 \*\* and balancing time 300S, adsorbate  $\text{N}_2$ , air thermostat temperature [ of 40 \*\* ], and measurement temperature-cross-section area [ adsorption / of 0.162 nm ] <sup>2</sup>. It was 27A when the pole diameter of FSM-C16 was analyzed from the nitrogen absorption constant temperature line graph obtained by nitrogen absorption measurement. The specific surface area value was 970m<sup>2</sup>/g. Pore volume was 1.26cm<sup>3</sup>/g.

[0061]The industrial refining method was examined using adsorption to meso pore silica gel of a yew leaf extract origin black oil, and the meso pore silica gel (pole diameter of an average of 67A) by which desorption marketing is carried out. The above-mentioned black oil 954g was melted in the toluene 6L, and it stirred at the room temperature for 2 hours with die saw gel IR60(DAISO [ Co., Ltd. ] make: Particle diameter [ of 63-210 micrometers ], 67A of average pore sizes)1kg (150-200 rpm). Suction filtration of this mixture was carried out using the large-sized nutsche, and toluene was removed. Subsequently, this silica gel was put into the container with

an agitator, and the water 12L was added, it stirred for 30 minutes (about 200 rpm), and backwashing-by-water liquid (a) was removed by the large-sized nutsche. Then, the 35-% of the weight methanol aqueous solution of 1.2L performed stirring washing (about 200 rpm) of 1 hour, and operation of filtration for this silica gel twice, and methanol-swabbing liquid (b) was obtained 35% of the weight. condensing after every 1-hour 2 times stirring and extraction with the methanol 1.2L finally -- the desorption oil 218g (baccatine III 0.105%: -- 0.23 g) 7-xylo sill taxol 1.05%:2.29g, 10-deacetyl taxol 0.04%:0.09g, and taxinine 1.61%:3.51g were obtained. Operation of adsorption, washing, filtration, etc. can be smoothly performed, if an easy solid-liquid mixing device with a filter is used.

[0062]performing adsorption-detaching operation in a similar manner again using this desorption oil -- the 2nd desorption oil 100g (baccatine III 0.21%: -- 0.21 g) 7-xylo sill taxol 2.2%:2.20g, 10-deacetyl taxol 0.09%:0.09g, taxinine 3.45%:3.45g, backwashing-by-water liquid (c), and 35-% of the weight methanol-swabbing liquid (d) were obtained.

[0063]In adsorption to silica gel, and a desorption process, pass black oil-toluene mixed liquor to die saw gel IR60 with which the column was filled up, a taxane compound is made to stick to silica gel, and the method of making a taxane compound continuously eluted using various kinds of eluates can also be enforced. In the method of stirring above-mentioned black oil-toluene mixed liquor and silica gel, and on the other hand performing adsorption treatment, since a tar etc. adhere to the whole adsorbent uniformly, there is little generating of the loading between silica gel particles at the time of filtration, and elution operation by various kinds of eluates can be performed more easily.

[0064]Each penetrant remover (a), (b), (c), and (d) were summarized to one, and were condensed, and methanol was removed. The oils 207g (218 mg of cephalomanin and 10-deacetyl baccatine III 2.27g are included.) were collected from the oil reservoir obtained by adding equivalent weight of methyl acetate to this concentrate, and performing extract operation. Most of cephalomanin in a yew leaf extract and 10-deacetyl baccatine III had moved to this penetrant remover recovered oil. Since taxol also melted into water in very small quantities, it had been mixed, but there was little quantity. Although it seems that the solubility over the taxol in the state where it melted into the organic solvent, for example, methyl acetate, and the solvent of cephalomanin and 10-deacetyl baccatine III seldom changes, Silica gel is adsorbed, there is no methyl acetate, when the adsorbed molecule changes into a naked state, the soluble difference to a solvent arises more clearly among these compounds, and it is thought that such separation was attained by that cause.

[0065]By the method of this adsorption-desorption, cephalomanin and taxol which were difficult to dissociate were able to be effectively separated from the former. As for cephalomanin, only the minute amount was contained in the 2nd desorption oil, but taxol, the baccatine III, 7-xylo sill taxol, 10-deacetyl taxol, a taxinine, etc. were contained. Some other impurities 647g melted into wash water, and it was thought that it adhered or adsorbed and a part did not come out in silica gel. When acetone and methanol washed silica gel after desorption, it was understood that it is usable again.

[0066]working example -- the refining method was examined using FSM-C16 which are adsorption to meso-porous silica gel of a leaf extracted oil origin black oil, and desorption meso-porous silica gel 2 yew. The black oil 20g of working example 1 was dissolved in toluene 200mL, and it filtered after 2-hour stirring (150-200 rpm) at the room temperature with FSM-C16 [ 20-g ]. Water (250mL) and a 35-% of the weight methanol aqueous solution (250mLx2 time) extracted silica gel twice after washing and by methanol 250mL, and a 2.99-g desorption oil was obtained. Next, toluene and FSM-C16 [ 3-g ] were added to the desorption oil 2.99g, it processed similarly, and the 2nd desorption oil 1.37g was obtained. The taxinine was contained in this 2nd desorption oil 5.18% (71 mg).

[0067]The content of the taxinine of the 2nd desorption oil obtained using FSM-C16 was clearly higher than the content of the taxinine of the desorption oil obtained using die saw gel IR60, and the 2nd desorption oil. A taxane compound enters into the fine pores of FSM-C16, and this is considered to be because for selectivity to have gone up by the ability of a substance with a larger molecular diameter than 27 Å not to go into fine pores from the case of die saw gel.

[0068]The penetrant removers obtained by washing by the water of silica gel of refining working example 2 of the working example 310-deacetyl baccatine III and washing by a 35-% of the weight methanol aqueous solution were collected. Salvaged material was condensed and the oil was obtained. It added in the glass columns (7 cm in diameter, and bulking agent 14 cm in height) filled up with Wakogel LP gas-60C18 (made by Wako Pure Chem) 200g which is an ODS bulking agent about 20 g of this oil. Subsequently, column chromatography separation using the solution of a presentation of acetonitrile/water =10 / 90 - 90/10 (volume ratio) was performed as an eluate. Eluate: Methyl-acetate 50mL was added and extracted into the mixture of the oil and water which are produced by condensing the eluate fraction of acetonitrile/water =20 / 80 - 30/70 (volume ratio), and the water layer was removed. Subsequently, after adding anhydrous sodium sulfate to the oil reservoir obtained and making it dry, the oil 2.3g which condenses by an evaporator and contains 10-deacetyl baccatine III was obtained. Eluate: The oil containing 3.2 g of cephalomanin was obtained from the eluate fraction of acetonitrile/water =70 / 30 - 80/20 (volume ratio).

[0069]the oil 2.3g containing 10-deacetyl baccatine III -- a preparative isolation liquid chromatograph device (Shimazu LC-8A.) R-355-[ preparative isolation column YMC-ODS and ] 15, 5 cm[ in diameter ] x50 cm in length, the particle diameter of 10-20 micrometers, UV227nm, an eluate: It applied to methanol / acetonitrile / water =20/60/20 (volume ratio), and rate-of-flow 40 mL/min. The fraction including the peak of 10-deacetyl baccatine III was taken, it condensed by the evaporator (38 \*\* of bath temperature), and a 0.21-g white solid was obtained. This was recrystallized using diethylether and a 196-mg colorless crystal was obtained (75.0% of recovery rate from a black oil). This crystal is 222-223 \*\* in melting point, and is angle of rotation. [alpha] Are D=-41 degree (C= 0.40, methanol, 23 \*\*), and A mass spectrum, UV spectrum

(KBr disk) and a  $^1\text{H}$ -NMR spectrum ( $\text{CDCl}_3$ ) are in agreement with the preparation (U.S. SIGMA) of a reagent, Since it was in agreement with the data of document (J. Nat.Prod. Vol.45,466 (1982), J.Org.Chem. Vol.46, 1469 (1981)), it was confirmed that it is 10-deacetyl baccatine III.

[0070]The oil containing 3.2 g of cephalomanin separated in refining working example 3 of working example 4 cephalomanin. It added in the glass columns (2 cm[ in diameter ] x packed bed 32 cm in length) filled up with 50 g of silica gel by Merk (Kieselgel 60, particle diameter of 63-200 micrometers), and fractionation was carried out with the mixed liquor of eluate:hexane / acetone =2 / 1 (volume ratio). Each fraction liquid was condensed, the concentrate was dissolved in methanol, and HPLC analysis was conducted, respectively. And 265 mg of oils containing cephalomanin were obtained. This oil was refined using the preparative isolation liquid chromatograph device used in working example 3. Fractionation was carried out as an eluate on condition of for acetonitrile / 10mM ammonium acetate solution =50/50 (volume ratio), UV detector wavelength [ of 227 nm ], and rate-of-flow 40mL/. Fraction liquid was condensed, it processed like the case of 10-deacetyl baccatine III, and a 19-mg white solid was obtained. This was recrystallized with the methanol aqueous solution and a 17-mg colorless crystal was obtained. When analyzed by HPLC, it was 99.6% of purity (cephalomanin in 73.9% of a recovery rate, and the oil for black). The melting point is 184-186 \*\*, and is angle of rotation. [alpha] Are D=-41 degree (C= 0.39, methanol, 23 \*\*), and A mass spectrum, Since UV spectrum and the  $^1\text{H}$ -NMR spectrum ( $\text{CDCl}_3$ ) were in agreement with the value of document (J. Org.Chem. Vol.46, 1469 (1981)), it was checked that this crystal is cephalomanin.

[0071]The baccatine III, 7-xylotaxol, and a taxinine were divided into the 5th working example. First, purification treatment which consists of the following four processes about the 2nd desorption oil 100g obtained in working example 1 was performed.

(1) Silica gel column chromatography using hexane / acetone system eluate (a bulking agent is Wakogel C-300 (made by Wako Pure Chem)).

(2) The reverse phase column chromatography using acetonitrile / drainage system eluate (a bulking agent is Wakogel LP gas-60C18 (made by Wako Pure Chem)).

(3) Column chromatography which makes methanol an eluate (the bulking agent collected the ingredients of the about [ LH-20;450-1000 ] molecular weight.).

(4) Silica gel column chromatography using hexane / acetone system eluate (a bulking agent is silica gel Kieselgel 60 by Merk).

[0072] These four operations were performed and the pretreatment oil 46.0g (baccatine III 0.52%:239mg, 7-xylo sill taxol 4.6%:2.13g, 10-deacetyl taxol 0.19%:90mg, and taxinine 7.30%:3.36g are included.) was obtained.

[0073] The pretreatment oils 15-16g obtained in working example 6 working example 5 are dissolved in a small amount of acetonitrile, a preparative isolation liquid chromatograph device (Soken Chemical & Engineering Hi-Sep LC Prep C-500 and an ODS PAKKUDO column.) Eluate:acetonitrile / water after pouring into the particle diameter of 10-20 micrometers, column 10-cmx50 cm in length, and 2 = it operated on the UV detector wavelength of 227 nm by 68/32 (volume ratio) and rate-of-flow 160mL/. [ in diameter ] The peak as the preparation of 7-xylo sill taxol with same retention time was isolated preparatively. This fraction liquid was condensed by the evaporator (bath temperature of 35-40 \*\*), and supplied sodium chloride to residue, and 7-xylo sill taxol was salted out, and it extracted by methyl-acetate 50mL. The methyl-acetate solution was dried and condensed on anhydrous sodium sulfate. When the above-mentioned operation was performed 3 times, the preparative isolation oil 3.33g (60% of 7-xylo sill taxol content) was obtained.

[0074] When fractionation of the preparative isolation oil was carried out with silica gel column chromatography (silica gel Kieselgel 60, and packed bed 3 cm x25 cm by Merk in length, hexane/acetone system), the yellowish white solid 2.7g was obtained. [ in diameter ] Fractionation of this was further carried out with the column chromatography (hexane/acetone =2/1 (volume ratio)) filled up with silica gel by Merck Co. (Kieselgel 60) (50 g, packed bed 3 cm x 14 cm in diameter). When the fraction containing 7-xylo sill taxol was condensed and it recrystallized with isopropyl alcohol, the colorless crystal 1.96g of 7-xylo sill taxol was obtained. The recovery rate from extracted oil was 77.2%.

[0075] It was 99.3% when purity was measured by HPLC. The melting points are 236-238 \*\* and angle of rotation.  $[\alpha]_D^{25} = -23$  degree (C= 0.4, a pyridine solution, 23 \*\*), a mass spectrum, It was checked from the data of UV spectrum and the  $^1\text{H-NMR}$  spectrum having been in agreement with the analytical value of a preparation, and the analytical value of document (J. Nat.Prod., Vol.47, 131 (1984)) that the obtained crystal is 7-xylo sill taxol.

[0076] When the refining 7-xylo sill taxol of working example 7 taxinine was isolated preparatively with a preparative isolation liquid chromatograph device, the taxinine was also isolated preparatively simultaneously. That is, the peak which appears in the same retention time as the preparation (made by Wako Pure Chem) of a taxinine was isolated preparatively, and the fraction which mainly contains a taxinine was obtained. When this was condensed by the evaporator, it dried on re-extraction and anhydrous sodium sulfate by methyl acetate and it hardened by drying by the evaporator, a 3.6-g colorless solid was obtained. When this was recrystallized with the mixed liquor of a methylene chloride and ethyl acetate, a 3.12-g colorless solid was obtained. The recovery rate from the extracted oil of a taxinine was 75.5%. The purity in HPLC analysis was 99.4%. The melting points are 266-269 \*\* and angle of rotation.  $[\alpha]_D^{25}$  is  $+137$  degree (C= 0.4,  $\text{CHCl}_3$ , 23 \*\*), It was checked from the analytical value of the mass spectrum, UV spectrum, and the  $^1\text{H-NMR}$  spectrum ( $\text{CDCl}_3$ ) having been in agreement with the analytical value of a preparation, and the data of document (mandarin orange tree Akiro, a wood academic journal, Vol.40-1009 (1994)) that the obtained crystal is a taxinine.

[0077]When the refining 7-xylo sill taxol of working example 8 10-deacetyl taxol was isolated preparatively with a preparative isolation liquid chromatograph device, 10-deacetyl taxol was also isolated preparatively simultaneously. That is, the peak which appears in the same retention time as the preparation of 10-deacetyl taxol was isolated preparatively, and the fraction which mainly contains 10-deacetyl taxol was obtained. When this was processed like working example 7, an 81-mg colorless solid was obtained. When this was recrystallized with ethanol/water, a 72-mg colorless crystal was obtained (65.5% of recovery rate). The melting points are 194–196 °C and angle of rotation.  $[\alpha]_D^{25} = -3$  degree (C= 0.4, pyridine, 23 °C). It was checked from the spectrum data of a mass spectrum, UV,  $^1\text{H-NMR}$  ( $\text{CDCl}_3$ ), etc. having been in agreement with the data of document (J. Nat.Prod., Vol.44, 312 (1981)) that the obtained crystal is 10-deacetyl taxol.

[0078]At the time of preparative isolation of the refining 7-xylo sill taxol of the working example 9 baccatine III, it is the preparation baccatine III. 0.51 g of ingredients of the peak which appeared at the place of the same retention time as a preparation (SIGMA) were isolated preparatively. However, if HPLC analysis is conducted, other ingredients will be contained, and it decided to perform the conditions of a preparative isolation liquid chromatograph by better for separation of baccatine III condition, i.e., eluate presentation:acetonitrile / water, / methanol =20/60 / 20 (volume ratio). The preparative isolation liquid chromatograph device was operated on UV wavelength of 227 nm by rate-of-flow 40mL/using small Shimazu LC-8A. The fraction of the peak of the same retention time as a baccatine III preparation was isolated preparatively. When it condensed, it extracted with methyl acetate and it hardened by drying by the evaporator, a 230-mg white solid was obtained. When this was recrystallized in diethylether, 216 mg (77.1% of recovery rate) of colorless crystals were obtained. When this crystal was analyzed by HPLC, it was 99.4% of purity. Crystals are the melting point of 236–238 °C (decomposition), and angle of rotation.  $[\alpha]_D^{25} = -54$  degree (C= 0.41, methanol, 23 °C), and  $[\alpha]_D^{25} = -54$  degree (C= 0.41, methanol, 23 °C). A mass spectrum, It was checked from the data of UV and the  $^1\text{H-NMR}$  spectrum having been in agreement with the analytical value of a preparation, and the analytical value given in document (J. Org.Chem., Vol.46, 1469 (1981)) that the obtained crystal is the baccatine III.

[0079]comparative example 1 working example 1 -- the same -- a yew -- a leaf -- methanol -- it extracting with methyl acetate continuously and, alkali and the oil 10g (10-deacetyl baccatine III -- 0.22%) which carried out acid treatment Baccatine III 0.024%, 7-xylo sill taxol 0.23%, Taxinine 0.37% is included cephalomanin 0.023%. It dissolved in methylene chloride 50mL--toluene 50mL, and stirred at 200 rpm for the meso-porous silica gel 10g (made by Toyota Central R&D Labs.) with a pore diameter of 20 Å, and 2 hours using the magnetic stirrer. When it filtered, operation (it stirs with methanol for 1 hour, and filters) of extracting silica gel after adsorption treatment twice by methanol 50mL was performed and the collected methanol solution was condensed, the obtained desorption oil was only 1.4g. It turned out that there is no taxane compound even if it analyzes this desorption oil, and most taxane compounds are not adsorbed by this silica gel. As a result, in the pore diameter of 20 Å, the hole was small and it turned out that a taxane compound cannot be entered.

[0080]The same purification treatment as working example 5 was performed without carrying out operation of adsorption and desorption for the same oil 100g as having used by the comparative example 2 comparative example 1. As a result, a 39-g pretreatment oil was obtained (10-deacetyl baccatine III 0.56%, baccatine III 0.06%, 7-xylo sill taxol 0.59%, and cephalomanin 0.059% and taxinine 0.94%). The concentration of many of each taxane compounds obtained by this example was smaller than the concentration of the pretreatment oil of working example 5. 15 g of the pretreatment oil obtained here was taken, and refining by a preparative isolation liquid chromatograph device was performed on the conditions same with having carried out in working example 6. As a result, the peak in

chromatogram was not able to lap and 10-deacetyl baccatine III and the baccatine III were not able to separate these. A part of peak was also able to lap taxol and cephalomanin, and was not able to separate them. Eluate presentation with another 10-deacetyl baccatine III and baccatine III : if it re-refines by acetonitrile / water / methanol =20/60 / 20 (volume ratio), will dissociate, but. Even if taxol and cephalomanin changed the eluate presentation, they were understood that separation is difficult with preparative liquid chromatography.

[0081]

[Effect of the Invention]By separating a taxane compound component from the mixture containing a taxane compound by the easy method of operation of adsorption and elution according to the refining method of this invention. Simplify refining operation, refining of the taxane compound which suppressed the loss of the taxane compound at the time of refining further is attained, and the effect that a taxane compound can be obtained efficiently is done so. According to the method of this invention, cephalomanin can be obtained easily.

[Translation done.]

(19)日本国特許庁 (J P)

(12) 公 開 特 許 公 報 (A)

(11)特許出願公開番号

特開2000-53668

(P2000-53668A)

(43)公開日 平成12年2月22日(2000.2.22)

(51)Int.Cl. <sup>7</sup>	識別記号	F I	テーマコード*(参考)
C 0 7 D 305/14		C 0 7 D 305/14	4 C 0 4 8
// C 0 7 B 63/00		C 0 7 B 63/00	F 4 H 0 0 6

審査請求 未請求 請求項の数9 O L (全 10 頁)

(21)出願番号 特願平10-227175

(22)出願日 平成10年8月11日(1998.8.11)

(71)出願人 394021409

樹木生理機能性物質技術研究組合  
東京都中央区八丁堀3丁目5番8号

(72)発明者 加藤 忠蔵

東京都品川区上大崎2-3-4

(72)発明者 黒田 一幸

東京都中野区鷺宮4-4-7

(72)発明者 松本 繁章

奈良県大和郡山市城町1805-23

(72)発明者 久保田 実

大阪府河内長野市清見台3-14-10

(74)代理人 100095832

弁理士 細田 芳徳

最終頁に続く

(54)【発明の名称】 タキサン化合物含有成分の精製方法

(57)【要約】

【課題】タキサン化合物含有成分を効率良く入手するため、精製操作を簡略化し、さらには精製時のタキサン化合物のロスを抑えた精製方法を提供すること、並びに、セファロマニンの簡便な精製方法を提供すること。

【解決手段】1種以上のタキサン化合物を含有する混合物から、吸着剤として細孔径が25～120Åである多孔性材料を用いて該タキサン化合物を含有する成分を吸着し溶出させることを特徴とするタキサン化合物含有成分の精製方法、並びに、セファロマニンを含有する混合物から、吸着剤として細孔径が25～120Åである多孔性材料を用いてセファロマニンを吸着し、次いで、メタノール濃度が30～40重量%のメタノール水溶液で溶出させることを特徴とするセファロマニンの精製方法。

## 【特許請求の範囲】

【請求項1】 10-デアセチルバッカチンIII、バッカチンIII、セファロマニン、7-β-キシロシルタキソール、10-デアセチルタキソール及びタキシニンからなる群より選ばれた1種以上のタキサン化合物を含有する混合物から、吸着剤として細孔径が25～120Åである多孔性材料を用いて該タキサン化合物を含有する成分を吸着し溶出させることを特徴とするタキサン化合物含有成分の精製方法。

【請求項2】 多孔性材料がシリカゲルである請求項1記載の精製方法。

【請求項3】 シリカゲルがメソポーラスシリカゲルまたはメソポアシリカゲルである請求項2記載の精製方法。

【請求項4】 メソポーラスシリカゲルがカネマイトと一般式(1)



(但し、nは12～18である。)で示されるアルキルトリメチルアンモニウムクロライドを反応させて得られるものである請求項3記載の精製方法。

【請求項5】 タキサン化合物を含有する混合物が、植物由来の抽出物である請求項1～4いずれか記載の精製方法。

【請求項6】 植物がイチイ科の植物である請求項5記載の精製方法。

【請求項7】 吸着剤に吸着したタキサン化合物含有成分を溶出させる溶媒として、水溶性有機溶媒と水との混合液を用いる請求項1～6いずれか記載の精製方法。

【請求項8】 請求項1～7いずれか記載の方法により精製されるタキサン化合物含有成分をさらに精製してタキサン化合物を単離する精製工程を設けるタキサン化合物の精製方法。

【請求項9】 セファロマニンを含有する混合物から、吸着剤として細孔径が25～120Åである多孔性材料を用いてセファロマニンを吸着し、次いで、メタノール濃度が30～40重量%のメタノール水溶液で溶出させることを特徴とするセファロマニンの精製方法。

## 【発明の詳細な説明】

## 【0001】

【発明の属する技術分野】本発明はタキサン化合物含有成分の精製方法に関する。更に詳しくは、10-デアセチルバッカチンIII等のタキサン化合物を含有する混合物、特にイチイ科の植物又は該植物抽出物から吸着剤を用いてタキサン化合物含有成分を精製し、さらに選択的に分離し、精製する方法に関する。

## 【0002】

【従来の技術】タキサン化合物は医薬分野での利用が図られているジテルペン化合物であり、医薬として、あるいは医薬品の原料として使用しうる。かかるタキサン化合物としては、例えば、10-デアセチルバッカチンII

I、バッカチンIII、セファロマニン、7-β-キシロシルタキソール、10-デアセチルタキソール、タキシニン等が挙げられる。

【0003】タキソール及びタキサン化合物の生産は有機化学合成法でも検討されているが、工程が40～50工程と多く、収率も低いため、有機化学合成法で工業化するには現在のところ効率が悪い(Nature, 367, 630 (1994)、J. Am. Chem. Soc., 116, 1597, 1599 (1994)。

桑島：第41回香料・テルペンおよび精油化学に関する講演予稿集 S3 page (1997)等)。

【0004】現在、比較的容易にタキソール及びタキサン化合物を得る方法は、イチイ科樹木の枝葉から溶媒抽出する方法である。現在世界で販売されているタキソールは、イチイ科樹木から溶媒抽出し精製されたもの、あるいは同じくイチイ科樹木に含まれるタキソールの前駆物質である10-デアセチルバッカチンIIIから半合成によってタキソールに導いたものである。

【0005】イチイ科樹木からの抽出、精製方法としては主にカラムクロマトグラフィー、液体クロマトグラフィー、再結晶等の方法が報告されている。例えば、Pharmaceutical Research, Vol. 12, No. 12, 1003 (1995)。

、特開平8-127574号公報、その他超臨界抽出の方法(特開平5-202016号公報)等が挙げられる。

【0006】しかしながら、イチイ科樹木からの抽出物には50種類以上の低分子の化合物とリグニン及びリグニン-糖化合物、タールといわれる粘稠な物質等が含まれている。カラムクロマトグラフィーによりタキサン化合物を分離する方法では、タールやリグニン等で充填剤が目詰まりを起こしてしまうため、分離は困難である。タールやリグニン等を完全に除いておかないと精製の後半で用いる分取液体クロマトグラフ装置の高価なカラムが汚れ、カラムの寿命が短くなってしまう。そのため、大量のタールとリグニン等を除去する必要があり、除去のために非常に煩雑な操作が行われている。

【0007】また、抽出溶媒としてリグニンやタール等を溶解しにくい溶媒を用いて抽出物を得たとしても、極性が低い溶媒を用いた場合、タキサン化合物の抽出効率は悪い。しかも、該抽出物にタキサン化合物以外の多種類の低分子化合物が含まれていることには変わりがなく、精製の効率性、操作性に課題を残すものである。

【0008】これらの操作においては、タキサン化合物が微量にしか含まれていないためにタール分、リグニン等の分離中に充填剤中に分散して吸着され、少量しか回収できない、操作の過程で変質してしまう、あるいはカラム等に吸着されて出てこない等の問題点が挙げられる。

【0009】またCO<sub>2</sub>ガスによる超臨界抽出の方法ではタール分やリグニン類は抽出されにくい、タキサン化合物の植物体からの回収率がメタノール抽出等と比べ



て低く、また高圧で行わなければならないことや、大型の工業用超臨界抽出の装置が非常に高価であるといった問題が挙げられる。

【0010】タキソールやタキサン化合物は非常に高価な試薬あるいは医薬品であるが、樹木に含まれるこれらの化合物の量は数10～数100ppmと少なく、世界の増加する癌患者に投与するには足りない状況である。従って、精製時のロスによる経済的な損失は大きい。

【0011】また、タキサン化合物の精製時にセファロマニンは不純物として残り、分取液体クロマトグラフィーを用いても容易に他のタキサン化合物とは分離しなかった。従来分離法としてはタキサン化合物の混合物に $-70^{\circ}\text{C}$ でオゾン酸化反応を行い、セファロマニンを酸化して分離しやすい誘導体にする方法(K. V. Rao et al., *Pharmaceutical Research*, Vol. 12, 1003 (1995))あるいは臭素を混合物に反応させ、セファロマニンを臭素化して分離しやすい誘導体にする方法(J. M. Rinaldi et al., *J. Nat. Prod.*, Vol. 59, 167-168 (1996))が知られている。しかし、 $-70^{\circ}\text{C}$ でオゾン酸化するのは大型装置となると煩雑である。また臭素化反応では臭素で他のタキサン化合物が変異する副反応が起こるので、反応のコントロールがむずかしいといった問題がある。

【0012】

【発明が解決しようとする課題】本発明の目的は、タキサン化合物含有成分を効率良く入手するため、精製操作を簡略化し、さらには精製時のタキサン化合物のロスを抑えた精製方法を提供することにある。さらに本発明の目的は、セファロマニンの簡便な精製方法を提供することにある。

【0013】

【課題を解決するための手段】即ち、本発明の要旨は、〔1〕 10-デアセチルバッカチンIII、バッカチンIII、セファロマニン、7- $\beta$ -キシロシルタキソール、10-デアセチルタキソール及びタキシニンからなる群より選ばれた1種以上のタキサン化合物を含有する混合物から、吸着剤として細孔径が25～120Åである多孔性材料を用いて該タキサン化合物を含有する成分を吸着し溶出させることを特徴とするタキサン化合物含有成分の精製方法、〔2〕 前記〔1〕記載の方法により精製されるタキサン化合物含有成分をさらに精製してタキサン化合物を単離する精製工程を設けるタキサン化合物の精製方法、〔3〕 セファロマニンを含有する混合物から、吸着剤として細孔径が25～120Åである多孔性材料を用いてセファロマニンを吸着し、次いで、メタノール濃度が30～40重量%のメタノール水溶液で溶出させることを特徴とするセファロマニンの精製方法、に関するものである。

【0014】

【発明の実施の形態】本発明のタキサン化合物含有成分

の精製方法は、タキサン化合物を含有する混合物から、吸着剤として細孔径が25～120Åである多孔性材料を用いてタキサン化合物含有成分を吸着し溶出させることを特徴とするものである。

【0015】本明細書において「タキサン化合物含有成分」とは、10-デアセチルバッカチンIII、バッカチンIII、7- $\beta$ -キシロシルタキソール、10-デアセチルタキソール、セファロマニン及びタキシニンからなる群より選ばれた1種以上のタキサン化合物の混合成分をいう。

【0016】本発明の精製方法は、大きく次の工程に分けることができる。

1) タキサン化合物を含有する混合物を多孔性材料に吸着させる工程。

2) タキサン化合物含有成分を吸着させた多孔性材料から、タキサン化合物含有成分を溶出させる工程。

以下、工程ごとに本発明を説明する。

【0017】1) タキサン化合物を含有する混合物を多孔性材料に吸着させる工程

本発明の方法において用いられるタキサン化合物を含有する混合物としては、タキサン化合物を含有するものであれば特に限定されるものではなく、例えば、植物又は植物由来の抽出物、該抽出物を公知の方法で部分的に精製を行った粗精製物、化学合成により得られる、副生成物等を含む混合物等が挙げられる。本発明においては、植物の葉、樹皮、根、小枝、種子、全実生などを粉碎したものをそのままタキサン化合物を含有する混合物として使用してもよいが、精製の効率化の点からみて、上記のような植物の葉などから抽出される抽出物などを、タキサン化合物を含有する混合物として用いる方が好ましい。

【0018】また、タキサン化合物を含有する混合物を、必要に応じて、アルカリ性の水溶液及び／又は酸性の水溶液で洗浄してもよい。このような洗浄操作により、カルボン酸やアルカロイド等を効果的に除去することができるため、好ましい。かかる洗浄操作は、有機化学の分野において一般的に行われる操作を採用することができる。

【0019】該植物としてはタキサン化合物を含有するものであれば特に限定されるものではないが、例えば、タキサン化合物を比較的多量に含むことから、イチイ科の植物等が挙げられる。イチイ科の植物としては、タクサス属の植物が好ましく、具体的にはT. brevifolia、T. baccata、T. media、T. wallichiana、T. canadensis、T. cuspidata、T. sumatrana等が挙げられる。

【0020】かかる植物からタキサン化合物を含有する混合物を抽出する方法は特に限定されるものではなく、溶媒抽出法等の公知の方法を用いることができる。溶媒

により抽出する方法としては通常用いられる方法であれば特に限定されるものではないが、例えば、上記の植物の葉、樹皮、根、小枝、種子、全実生等のタキサン化合物を含有する部分を粉碎し、溶媒で抽出する方法が挙げられる。抽出に用いる溶媒としてはタキサン化合物を溶解させることができるものであれば特に限定されるものではないが、メタノール、エタノール、クロロホルム、ジクロロメタン、酢酸メチル、酢酸エチル、アセトン等が挙げられる。かかる溶媒は単独で用いても良く、二種以上を混合して用いても良い。このようにして得られる抽出物は、タキサン化合物だけでなく、リグニン、タール等の成分を含んでいても構わない。

【0021】本発明に用いられる吸着剤としては細孔径が25～120Åである多孔性材料であれば特に限定されるものではない。

【0022】多孔性材料としては、細孔径が25～60Åのものが好ましく、より好ましくは30～50Å、特に好ましくは30～40Åである。タキサン化合物の分子の細孔への入りやすさの観点から25Å以上が好ましく、吸着される成分の選択性の観点から120Å以下が好ましい。

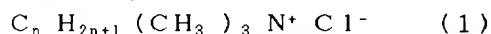
【0023】上記の範囲の細孔径は、従来より吸着剤として日常的に用いられている他の多孔性材料に比べて大きいので、本発明においては、通常多孔性材料では吸着されない程度の分子径を有するタキサン化合物を、本発明に用いられる多孔性材料の細孔内に捕捉することができる。

【0024】多孔性材料の材質としては、タキサン化合物を吸着し溶出させる能力を有するものであれば特に限定されるものではないが、好ましくは無機質多孔性のシリカゲルがよい。

【0025】シリカゲルとしては、タキサン化合物を吸着し溶出させ得るものであれば特に限定されるものではないが、所望の細孔径を有するメソポーラスシリカゲル、メソポアシリカゲル等が好ましい。特に本発明者らが鋭意研究の結果合成に成功した、メソポーラスシリカゲルの方が、細孔径の分布の幅が狭いことからより好ましい。

【0026】本発明に用いられるメソポーラスシリカゲルの合成方法としては、例えば、カネマイト ( $\text{NaHSi}_2\text{O}_5 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$ ) と一般式(1)

【0027】



【0028】で示されるアルキルトリメチルアンモニウムクロライドを反応させて合成する方法が挙げられる (T. Yanagisawa, T. Shimizu, K. Kuroda, C. Kato, Bull. Chem. Soc. Jpn., 63, 988 (1990))。

【0029】メソポーラスシリカゲルの合成に用いられ

るアルキルトリメチルアンモニウムクロライドとしては特に限定されるものではないが、一般式(1)で示されるアルキルトリメチルアンモニウムクロライドにおいて、nが12～18の範囲であるものが好ましく、より好ましくは14～18、特に好ましくは16～18である。アルキル基の炭素数が小さいと細孔径が小さくなるため、タキサン化合物の細孔への入りやすさの観点から炭素数は12以上が好ましく、アルキル基の炭素数が大きすぎると細孔径が大きすぎて他の化合物が入るため、選択性の維持の観点から、及び炭素数18以上のアルキル基を有するものは入手しにくいことから、炭素数は18以下が好ましい。

【0030】一般式(1)においてnが12～18の化合物を用いて、メソポーラスシリカゲルを調製した場合、そのメソポーラスシリカゲルは細孔径が約20～約40Åの蜂の巣状の孔を多数有する、比表面積値が900～1200m<sup>2</sup>/gのものである。

【0031】また、メソポアシリカゲルは、メソポーラスシリカゲルより細孔径の分布が広い多孔性シリカゲル系材料であり、種々の細孔径を有するものが市販されている。例えば、カセイゲル(東京化成製)には細孔径が10～80Åの広い範囲の細孔径を有しているものがあるが、細孔の数はメソポーラスシリカゲルより少なく、したがって比表面積値は250～500m<sup>2</sup>/gとより小さい。また、ダイソーゲル(ダイソー(株)製)も細孔径約60Å、比表面積約500m<sup>2</sup>/gを有するメソポアシリカゲルである。

【0032】上記のメソポーラスシリカゲルあるいはメソポアシリカゲルの中でも特に前者は本発明者らが鋭意研究の結果、所望の細孔径を有するものの合成に成功したもので、通常多孔性材料では吸着できない分子径の大きいタキサン化合物を、かかるゲル中の細孔内に捕捉することができる。

【0033】タキサン化合物含有成分を精製する方法としては、上記の吸着剤を用いるものであれば特に限定されるものではない。

【0034】本発明に用いられる多孔性材料の使用量は特に限定されるものではなく、混合物に含まれるタキサン化合物含有成分の含量により、自由に調節可能である。具体的には、タキサン化合物を含有する混合物の濃縮物重量の100分の1から50倍位までの量が好ましく、より好ましくは20分の1～20倍、特に好ましくは10分の1～10倍である。

【0035】ここで、タキサン化合物を含有する混合物の「濃縮物」とは、タキサン化合物を含有する混合物を、湯浴温度が35～40℃でエバポレータを用いて濃縮して得られるものである。

【0036】本発明に用いられる多孔性材料への吸着時に用いる溶媒としては、溶出用の溶媒よりも極性が小さいものであって、タキサン化合物を含有する混合物のほ

とんどを溶解し得るものであれば特に限定されるものではなく、例えば、ジクロロメタン、トルエン、ベンゼン、クロロホルム等が挙げられる。これらは単独で用いてもよく、混合して用いてもよい。

【0037】また、植物からタキサン化合物を抽出した際に用いた溶媒が吸着時に用いる溶媒としても用いることができる場合、抽出物をそのまま多孔性材料と接触させても良い。抽出時の溶媒が吸着時の溶媒として用いることができない場合、抽出物から溶媒を除いた後、適切な吸着溶媒を加えれば良い。

【0038】吸着溶媒の使用量については特に限定されるものではないが、タキサン化合物を含有する混合物の濃縮物の重量の3～1000倍程度が好ましく、より好ましくは5～800倍、特に好ましくは5～50倍である。

【0039】タキサン化合物含有成分を所定の細孔径を有する多孔性材料に吸着させる方法としては、特に限定されない。例えば、本発明に用いられる多孔性材料とタキサン化合物を含有する混合物とを適当な時間一緒に攪拌させたり、本発明で用いられる多孔性材料をカラムに充填し、該混合物をカラムに負荷する態様等が挙げられる。

【0040】このようにして、タキサン化合物を含有する混合物と多孔性材料とを接触させることにより、多孔性材料の孔の中に極性のある化合物や、極性は中程度で分子量が450～1000程度の化合物（タキサン化合物が含まれる。）が吸着する。吸着されなかった化合物は、吸着時に用いた溶媒と同じ溶媒で洗い流して除去する。

【0041】タキサン化合物含有成分が吸着した多孔性材料からタキサン化合物含有成分を溶出させる前に、該多孔性材料を洗浄しても良い。洗浄に用いる溶媒としては水が好適なものとして挙げられる。タキサン化合物含有成分が吸着した多孔性材料に水を加えると、タキサン化合物含有成分以外の極性のある化合物の多くが溶出する。続いて30～40重量%のメタノール水溶液で溶出するとタキサン化合物のうちセファロマニンと10-デアセチルバッカチンIIIが洗浄液に選択的に溶け出し、他の成分等と分離することができる。即ち、かかる濃度のメタノール水溶液で溶出することにより、セファロマニンを効率的に精製することができる。メタノール水溶液の濃度は、35～40重量%がより好ましい。セファロマニンを精製する場合、セファロマニンを含有する混合物としては、上記のタキサン化合物を含有する混合物が挙げられる。

【0042】2) タキサン化合物含有成分を吸着させた多孔性材料から、タキサン化合物含有成分を溶出させる工程

タキサン化合物含有成分の溶出に用いる溶媒としては、タキサン化合物含有成分の溶出に適したものであれば特

に限定されるものではなく、例えば、水溶性有機溶媒と水との混合液が挙げられる。水溶性有機溶媒としては、メタノール、エタノール、アセトニトリル、アセトン等が挙げられる。混合液中の有機溶媒量は特に限定されない。吸着材料の特性に合わせて水と有機溶媒の混合比を変えて使用することが好ましい。

【0043】溶出溶媒の使用量については特に限定されるものではないが、タキサン化合物を含有する混合物の濃縮物の重量の2～1000倍程度が好ましく、より好ましくは5～800倍、特に好ましくは10～500倍である。

【0044】タキサン化合物含有成分が吸着した多孔性材料から、タキサン化合物含有成分を溶出させることで脱着させる方法としては、タキサン化合物含有成分の溶出に用いる溶媒と多孔性材料を接触させればよい。具体的には、多孔性材料と該溶媒とを適当な時間一緒に攪拌させたり、多孔性材料をカラムに充填して該溶媒をそのカラムに流す態様等が挙げられる。

【0045】このようにして、上記の溶出溶媒を多孔性材料と接触させることにより、タキサン化合物含有成分のほとんどが溶出し、脱着される。

【0046】このように、本発明の精製方法は、従来の方法に比べて極めて簡単な操作で効果的にタキサン化合物含有成分を選択的に分離、精製することができる。

【0047】メソポアシリカゲルであるダイソーゲル（平均細孔径67Å）を用いた吸着剤では、吸着後、吸着剤を水及び35重量%メタノール水溶液で洗浄すると、吸着されたタキサン化合物のうちセファロマニンと10-デアセチルバッカチンIIIが優先的に溶出される。その後、吸着剤をメタノールで処理し、他のタキサン化合物を溶出させることができる。このように、タキサン化合物と言っても、溶出液に対する個々の化合物の溶解性が異なるので、その点を利用して各タキサン化合物を効果的に分離することができる。また、吸着剤の種類や細孔径の大きさによってもタキサン化合物の各々の化合物によっても溶出の状態は多少の差異が認められる。

【0048】本発明の方法によれば、セファロマニンについても、この多孔性シリカゲルでの吸着、洗浄によって、比較的容易にタキソール等から分離、精製することができる。また、メソポアシリカゲルに吸着され、メタノール溶出液で溶出されたタキサン化合物は、タール分やリグニン等が除かれたことによって吸着前の数倍の含有量となって、より高度に精製され、次の精製工程で容易に単離される。

【0049】また、タキサン化合物含有成分が溶出された後の多孔性材料を、メタノール、アセトン等の溶媒で洗浄してリグニンやタール等を多孔性材料から除去し、次いでジクロロメタン、トルエン等の溶媒で洗浄することにより、得られる洗浄後の多孔性材料をタキサン化合

物含有成分の吸着、溶出のために再利用することができる。

### 【0050】3) 精製工程

さらに本発明においては、上記の方法により精製されるタキサン化合物含有成分をさらに精製してタキサン化合物を単離する精製工程を設けても良い。かかる工程を設けることにより、タキサン化合物をより高純度に精製することができ、各化合物を単離することが可能となる。取り分け、上記のような、特定の多孔性材料にタキサン化合物含有成分を吸着、溶出させる方法により得られるタキサン化合物含有成分は、カラムクロマトグラフィーや高速液体クロマトグラフィー (HPLC) 等による精製操作を困難にする成分 (リグニンやタール等) が効果的に除かれているため、かかる精製操作を容易に組み合わせることができる。そのため、より高度にタキサン化合物を単離精製することが簡単にできる。

【0051】精製工程で用いることのできる精製手段としては、従来より公知のタキサン化合物等の有機化合物の精製方法に用いられる方法が挙げられる。例えば、高速液体クロマトグラフィー (HPLC)、超臨界流体クロマトグラフィー、再結晶等の方法が挙げられる。また、セファデックス LH-20 (商品名) 等を用いるゲル汙過クロマトグラフィー、カラムクロマトグラフィー等も用いることができる。これらの方法は単独で実施しても良く、二種以上の方法を組み合わせて行っても良い。また、二種以上の方法を組み合わせて精製する場合、HPLCで精製する前に他の精製方法を実施することがより好ましい。このことにより、HPLCの充填剤の寿命を長くすることができる。

【0052】上記の方法によって、10-デアセチルバッカチンIII、バッカチンIII、7-β-キシロシルタキソール、10-デアセチルタキソール、セファロマニン、タキシニン等について単離精製することができる。

### 【0053】

【実施例】以下、実施例及び比較例により本発明をさらに詳しく説明するが、本発明はかかる実施例等により何ら限定されるものではない。

### 【0054】実施例1

#### イチイ葉抽出物の調製

イチイ生葉100kg (直径5mm以下の小枝を含む。)を、粉碎機: ラージ300TC型 (タニナカ (株) 製) を用いて粉碎して1mm×2mm程度の粉碎物を得た。この粉碎物を100meshの金網を底部に張ったステンレス容器 (200~400L容、抽出液を底から抜くためのバルブ付き) に投入した。ヘキサン150Lで2日間浸して葉のロウ分を溶解し、ヘキサンを抜いた。続いてメタノール150Lを入れ、時々攪拌しながら20~25℃で4日間浸した。メタノールによる抽出液をステンレス容器の底から取り出した。容器に残った残渣をメタノール100Lで洗って得られる洗浄液

を上記メタノール抽出液に加えた。このメタノール抽出液を湯温35~40℃の大型エバポレーターで濃縮し、水と油の混合液21Lを得た。この混合液を100L容の攪拌機付きの釜に入れ、さらに酢酸メチル20Lと飽和芒硝水10Lを加えて20分間攪拌した。その後釜を静置し、釜から水層を分離除去した。残った油層に再度飽和芒硝水10Lを加えて洗浄後、再び水層と油層とを分離して、15Lの油層を得た。

【0055】15Lの油層を濃縮して、タキサン化合物、タール分、リグニン等をはじめとする多数の成分が含まれる暗緑色の混合油3050gを得た。この暗緑色の混合油をイチイ葉抽出物とした。

【0056】イチイ葉抽出物、及び各精製工程で得られる抽出物等のタキサン化合物の分析、定量は高速液体クロマトグラフ (略称HPLC) で行った。装置は島津製作所製LC-10A、カラムはセンシユー科学製Pegasil C8カラム (直径4.6mm、長さ25cm)、UV検知器波長227nm、溶出液: アセトニトリル/10mM酢酸アンモニウム水溶液=45/55 (容積比)、流速0.6mL/分の条件で分析した。予め標品を用いてUV吸収強度の検量線を作成しておき、その検量線を用いて成分の定量を行った。イチイ葉抽出物 (3050g) 中の各成分の含量は、10-デアセチルバッカチンIII 2.71g、バッカチンIII 0.28g、7-キシロシルタキソール2.54g、セファロマニン0.24g、10-デアセチルタキソール0.11g、タキシニン4.13gであった。

### 【0057】イチイ葉抽出物の洗浄

イチイ葉抽出物はカルボン酸やアルカロイド等を含んでおり、これを前もって除去しておくことが好ましい。イチイ葉抽出物15Lに5%水酸化ナトリウム-半飽和芒硝水7Lを加え、200~300rpmで10分間攪拌した。20分間静置後、水層を除去した。この操作をもう1回行った。次に酢酸メチル10Lを油層であるイチイ葉抽出物に加え、さらに5%塩酸-5%メタノール水溶液7Lを加えて上記と同様の方法で2回洗浄した。分離後の油層を1/10飽和重曹水-飽和芒硝水10L (容積比) で洗い、次いで洗浄液の油層を液温35~40℃で減圧濃縮して黒色油974gを得た。10-デアセチルバッカチンIII は2.27g (回収率83.9%)、バッカチンIII は0.24g (回収率86%)、7-キシロシルタキソールは2.34g (回収率92.1%)、セファロマニンは0.22g (回収率91.1%)、10-デアセチルタキソールは0.095g (回収率86.4%)、タキシニンは3.59g (回収率86.9%) が黒色油中に含まれていた。

### 【0058】メソポーラスシリカ (FSM-C16) の合成

高純度水ガラスと2N水酸化ナトリウム水溶液とをSiO<sub>2</sub>/Na<sub>2</sub>O=2.0になるように調整後、1日間攪

拌した。それを750℃、1時間、空気雰囲気下で焼成を行い、 $\delta\text{-Na}_2\text{Si}_2\text{O}_5$ を得た。得られた50gの $\delta\text{-Na}_2\text{Si}_2\text{O}_5$ を水1Lに分散させ、30分間攪拌を行い、スラリー状のカネマイトを得た。そのスラリー状のカネマイトを0.1モル/Lのヘキサデシルトリメチルアンモニウムクロライド水溶液に分散させ、70℃で3時間攪拌を行った。その後遠心分離で上澄み液を除去し、沈澱を水に分散させた。次いで2N塩酸でpH8.5に調整後、遠心分離を行い、沈澱を得た。沈澱を風乾し、水による洗浄を行った。得られた粉末を電気炉に入れ、700℃で3時間の焼成を行うと、45gのメソポーラスシリカゲル(略称FSM-C16)が得られた。メソポーラスシリカの合成の確認はXRD分析、窒素吸着測定により行った。

【0059】XRD分析にはX線発生装置(線源1.54050Å(Cu)、3kw)、モノクロメータ(管電圧40kV、管電流30mA)を使用し、サンプリング幅0.01deg、走査速度2deg/min、発散スリット1deg、散乱スリット1deg、受光スリット0.15mmの条件で分析を行った。このようなXRD分析により、均一で大きな細孔径のハニカム構造のシリカゲルであることが確認された。

【0060】窒素吸着測定は日本ベル(株)製のBERSORP28SA型装置を用いた。サンプルを $10^{-2}$ Torr、40℃の条件で6時間乾燥させた後、平衡時間300S、吸着質 $\text{N}_2$ 、空気恒温槽温度40℃、測定温度-196℃、吸着断面積0.162nm<sup>2</sup>で行った。FSM-C16の細孔径を窒素吸着測定により得られる窒素吸着等温線グラフから解析したところ、27Åであった。また、比表面積値は970m<sup>2</sup>/gであった。また、細孔容積は1.26cm<sup>3</sup>/gであった。

【0061】イチイ葉抽出物由来黒色油のメソポーラスシリカゲルへの吸着、脱着市販されているメソポーラスシリカゲル(細孔径平均67Å)を用いて工業的な精製方法を検討した。上記の黒色油954gをトルエン6Lに溶かし、ダイソーゲルIR60(ダイソー(株)製:粒子径63~210μm、平均細孔径67Å)1kgと共に2時間室温で攪拌した(150~200rpm)。この混合物を大型ヌッチェを用いて吸引濾過して、トルエンを除いた。次いで、このシリカゲルを攪拌機付きの容器に入れ、水12Lを加えて30分間攪拌(200rpm程度)し、大型ヌッチェで水洗浄液(a)を除去した。続いてこのシリカゲルを、1.2Lの35重量%メタノール水溶液で1時間の攪拌洗浄(200rpm程度)、濾過の操作を2回行い、35重量%メタノール洗浄液(b)を得た。最後にメタノール1.2Lで1時間ずつ2回攪拌、抽出後、濃縮して脱着油218g(バックチンIII 0.105%:0.23g、7-キシロシルタキソール1.05%:2.29g、10-デアセチルタキソール0.04%:0.09g、タキシニン1.61

%:3.51g)を得た。なお、吸着、洗浄、濾過などの操作は簡単な濾過板付きの固液混合装置を用いればスムーズに行うことができる。

【0062】この脱着油を用いて再度、吸着-脱着操作を同様にを行い、2度目の脱着油100g(バックチンIII 0.21%:0.21g、7-キシロシルタキソール2.2%:2.20g、10-デアセチルタキソール0.09%:0.09g、タキシニン3.45%:3.45g)、水洗浄液(c)、35重量%メタノール洗浄液(d)を得た。

【0063】シリカゲルへの吸着、脱着工程において、カラムに充填したダイソーゲルIR60に黒色油-トルエン混合液を流してタキサン化合物をシリカゲルに吸着させ、続いて各種の溶出液を用いてタキサン化合物を溶出させるという方法も実施できる。一方、上記の、黒色油-トルエン混合液とシリカゲルとを攪拌して吸着処理を行う方法では、タール分等が吸着剤の全体にまんべんなく付着するため、濾過時にシリカゲル粒子間の目づまりの発生が少なく、各種の溶出液による溶出操作をより容易に行うことができる。

【0064】各洗浄液(a)、(b)、(c)、(d)を一つにまとめ、そして濃縮してメタノールを除いた。この濃縮物に等量の酢酸メチルを加えて抽出操作を行い、得られた油層から油207g(セファロマニン218mg、10-デアセチルバックチンIII 2.27gを含む。)を回収した。イチイ葉抽出物中のセファロマニン、10-デアセチルバックチンIIIのほとんどがこの洗浄液回収油に移っていた。タキソールも水に微量溶けるので混じっているが、量は少なかった。有機溶剤、例えば酢酸メチルに溶けた状態でのタキソールとセファロマニン、10-デアセチルバックチンIIIの溶媒に対する溶解性はあまり変わらないと思われるが、シリカゲルに吸着され、酢酸メチルがなく、吸着された分子が裸の状態になった時、これら化合物間に溶媒に対する溶解性の違いがより明確に生じ、それによりこのような分離が可能になったものと考えられる。

【0065】この吸着-脱着の方法で、従来より分離が困難であったセファロマニンとタキソールとを効果的に分離することができた。2度目の脱着油にはセファロマニンは微量しか含まれておらず、タキソール、バックチンIII、7-キシロシルタキソール、10-デアセチルタキソール、タキシニン等が含まれていた。その他の不純物647gの一部は洗浄水に溶け、一部はシリカゲルに付着、あるいは吸着されて出てこないものと考えられた。脱着後のシリカゲルはアセトン、メタノールで洗浄すると、再び使用可能であることがわかった。

#### 【0066】実施例2

イチイ葉抽出物由来黒色油のメソポーラスシリカゲルへの吸着、脱着  
メソポーラスシリカゲルであるFSM-C16を用いて

精製方法を検討した。実施例1の黒色油20gをトルエン200mLに溶解し、20gのFSM-C16と共に室温で2時間攪拌後(150~200rpm)、濾過した。シリカゲルを水(250mL)及び、35重量%メタノール水溶液(250mL×2回)で洗浄後、メタノール250mLで2回抽出して2.99gの脱着油を得た。次に脱着油2.99gにトルエンと3gのFSM-C16を加えて同様に処理し、2回目の脱着油1.37gを得た。この2回目の脱着油には、タキシニンが5.18%(71mg)含まれていた。

【0067】FSM-C16を用いて得られた2回目の脱着油のタキシニンの含量は、ダイソーゲルIR60を用いて得られた脱着油及び2度目の脱着油のタキシニンの含量よりも明らかに高いものであった。これは、FSM-C16の細孔にタキサン化合物が入り込み、27Åよりも分子径が大きい物質が細孔に入れないことでダイソーゲルの場合より選択性が上がったことによるものと考えられる。

#### 【0068】実施例3

##### 10-デアセチルバッカチンIIIの精製

実施例2のシリカゲルの水による洗浄、及び35重量%メタノール水溶液による洗浄で得られた洗浄液を回収した。回収物を濃縮し、油を得た。この油の20gをODS充填剤であるWakogel LP-60C18(和光純薬(株)製)200gを充填したガラス製のカラム(直径7cm、充填剤高さ14cm)に添加した。次いで、溶出液としてアセトニトリル/水=10/90~90/10(容積比)の組成の溶液を用いるカラムクロマトグラフィー分離を行った。溶出液:アセトニトリル/水=20/80~30/70(容積比)の溶出画分を濃縮して得られる油と水の混合物に酢酸メチル50mLを加え、抽出して水層を除いた。次いで、得られる油層に無水硫酸ナトリウムを加えて乾燥させた後、エバポレーターで濃縮して10-デアセチルバッカチンIIIを含む油2.3gを得た。また溶出液:アセトニトリル/水=70/30~80/20(容積比)の溶出画分から3.2gのセファロマニンを含む油が得られた。

【0069】10-デアセチルバッカチンIIIを含む油2.3gを分取液体クロマトグラフ装置(島津LC-8A、分取カラムYMC-ODS、R-355-15、直径5cm×長さ50cm、粒子径10~20μm、UV227nm、溶出液:メタノール/アセトニトリル/水=20/60/20(容積比)、流速40mL/min)にかけた。10-デアセチルバッカチンIIIのピークを含む画分をとり、エバポレーターで濃縮(浴温38℃)して0.21gの白色固体を得た。これをジエチルエーテルを用いて再結晶して196mgの無色結晶を得た(黒色油からの回収率75.0%)。この結晶は、融点222~223℃で旋光度 $[\alpha]_D = -41^\circ$ (C=0.40、メタノール、23℃)であり、マスペクト

ル、UVスペクトル(KBr disk)、 $^1\text{H-NMR}$ スペクトル(CDC1<sub>3</sub>)が試薬の標品(アメリカのSIGMA社)と一致し、また文献(J.Nat.Prod. Vol. 45, 466(1982)、J.Org.Chem. Vol. 46, 1469(1981))のデータと一致したことから10-デアセチルバッカチンIIIであることが確かめられた。

#### 【0070】実施例4

##### セファロマニンの精製

実施例3で分離した3.2gのセファロマニンを含む油を、Merk社製シリカゲル(Kieselgel 60、粒子径63~200μm)50gを充填したガラス製カラム(直径2cm×充填層長さ32cm)に添加し、溶出液:ヘキサン/アセトン=2/1(容積比)の混合液で分画した。各分画液を濃縮し、濃縮物をメタノールに溶解させてそれぞれHPLC分析を行った。そしてセファロマニンを含む油265mgを得た。この油を実施例3で用いた分取液体クロマトグラフ装置を用いて精製した。溶出液としてアセトニトリル/10mM酢酸アンモニウム水溶液=50/50(容積比)、UV検出器波長227nm、流速40mL/分の条件で分画した。分画液を濃縮し、10-デアセチルバッカチンIIIの場合と同様に処理して19mgの白色固体を得た。これをメタノール水溶液で再結晶して17mgの無色結晶を得た。HPLCで分析すると99.6%の純度であった(回収率73.9%、対黒色油中のセファロマニン)。融点は184~186℃で、旋光度 $[\alpha]_D = -41^\circ$ (C=0.39、メタノール、23℃)であり、マスペクトル、UVスペクトル、 $^1\text{H-NMR}$ スペクトル(CDC1<sub>3</sub>)は文献(J.Org.Chem. Vol. 46, 1469(1981))の値と一致したことから、この結晶はセファロマニンであることが確認された。

#### 【0071】実施例5

次にバッカチンIII、7-キシロシルタキソール、タキシニンを分離した。まず、実施例1で得られた2度目の脱着油100gについて、以下の4工程からなる精製処理を行った。

(1)ヘキサン/アセトン系溶出液を用いるシリカゲルカラムクロマトグラフィー(充填剤はWakogel C-300(和光純薬製))。

(2)アセトニトリル/水系溶出液を用いる逆相カラムクロマトグラフィー(充填剤はWakogel LP-60C18(和光純薬製))。

(3)メタノールを溶出液とするカラムクロマトグラフィー(充填剤はLH-20;450~1000程度の分子量の成分を集めた)。

(4)ヘキサン/アセトン系溶出液を用いるシリカゲルカラムクロマトグラフィー(充填剤はMerk社製シリカゲルKieselgel 60)。

【0072】この4操作を行って、前処理油46.0g(バッカチンIII 0.52%:239mg、7-キシロ



シルタキソール4.6%:2.13g、10-デアセチルタキソール0.19%:90mg、タキシニン7.30%:3.36gを含む。)を得た。

#### 【0073】実施例6

実施例5で得られた前処理油15~16gを少量のアセトニトリルに溶解し、分取液体クロマトグラフ装置(綜研化学Hi-Sep LC Prep C-500、及びODSバックドカラム、粒子径10~20 $\mu$ m、カラム直径10cm×長さ50cm、2本)に注入後、溶出液:アセトニトリル/水=68/32(容積比)、流速160mL/分、UV検出器波長227nmで運転した。保持時間が7-キシロシルタキソールの標品と同一のピークを分取した。この分画液をエバポレーターで濃縮(バス温35~40℃)し、残渣に塩化ナトリウムを投入して7-キシロシルタキソールを塩析すると共に、酢酸メチル50mLで抽出した。酢酸メチル溶液を無水硫酸ナトリウム上で乾燥して濃縮した。上記操作を3回行うと分取油3.33g(7-キシロシルタキソール含量60%)が得られた。

【0074】分取油をシリカゲルカラムクロマトグラフィー(Merk社製シリカゲルKieselgel 60、充填層直径3cm×長さ25cm、ヘキサン/アセトン系)で分画すると黄白色固体2.7gが得られた。これをメルク社製シリカゲル(Kieselgel 60)を充填(50g、直径3cm×14cmの充填層)したカラムクロマトグラフィー(ヘキサン/アセトン=2/1(容積比))でさらに分画した。7-キシロシルタキソールの入った画分を濃縮し、イソプロピルアルコールで再結晶すると、7-キシロシルタキソールの無色結晶1.96gが得られた。抽出油からの回収率は77.2%であった。

【0075】HPLCで純度を測定すると99.3%であった。融点は236~238℃、旋光度 $[\alpha]_D = -23^\circ$ (C=0.4、ピリジン溶液、23℃)、マスマスペクトル、UVスペクトル、 $^1\text{H-NMR}$ スペクトルのデータは標品の分析値及び文献(J.Nat.Prod., Vol.47, 131(1984))の分析値と一致したことから、得られた結晶は7-キシロシルタキソールであることが確認された。

#### 【0076】実施例7

##### タキシニンの精製

7-キシロシルタキソールを分取液体クロマトグラフ装置で分取した時に、タキシニンも同時に分取した。即ちタキシニンの標品(和光純薬(株)製)と同じ保持時間に現れるピークを分取し、タキシニンを主に含む画分を得た。これをエバポレーターで濃縮して酢酸メチルで再抽出、無水硫酸ナトリウム上で乾燥してエバポレーターで乾固すると3.6gの無色固体が得られた。これを塩化メチレンと酢酸エチルの混合液で再結晶すると3.12gの無色固体が得られた。タキシニンの抽出油からの

回収率は75.5%であった。HPLC分析での純度は99.4%であった。融点は266~269℃、旋光度 $[\alpha]_D = +137^\circ$ (C=0.4、 $\text{CHCl}_3$ 、23℃)であり、マスマスペクトル、UVスペクトル、 $^1\text{H-NMR}$ スペクトル( $\text{CDCl}_3$ )の分析値は標品の分析値及び文献(橋 燦郎、木材学会誌、Vol.40, 1009(1994))のデータと一致したことから、得られた結晶はタキシニンであることが確認された。

#### 【0077】実施例8

##### 10-デアセチルタキソールの精製

7-キシロシルタキソールを分取液体クロマトグラフ装置で分取した時に、10-デアセチルタキソールも同時に分取した。即ち10-デアセチルタキソールの標品と同じ保持時間に現れるピークを分取し、10-デアセチルタキソールを主に含む画分を得た。これを実施例7と同様に処理すると81mgの無色固体が得られた。これをエタノール/水で再結晶すると、72mgの無色結晶が得られた(回収率65.5%)。融点は194~196℃、旋光度 $[\alpha]_D = -3^\circ$ (C=0.4、ピリジン、23℃)であった。マスマスペクトル、UV、 $^1\text{H-NMR}$ ( $\text{CDCl}_3$ )等のスペクトルデータは文献(J.Nat.Prod., Vol.44, 312(1981))のデータに一致したことから、得られた結晶は10-デアセチルタキソールであることが確認された。

#### 【0078】実施例9

##### バッカチンIIIの精製

7-キシロシルタキソールの分取の時に、標品バッカチンIII(SIGMA社)標品と同じ保持時間のところに現れたピークの成分0.51gを分取した。しかし、HPLC分析すると他の成分も入っており、分取液体クロマトグラフの条件をもっとバッカチンIIIの分離に良い条件、即ち溶出液組成:アセトニトリル/水/メタノール=20/60/20(容積比)で行うことにした。分取液体クロマトグラフ装置は小型の島津LC-8Aを用い、流速40mL/分、UV波長227nmで運転した。バッカチンIII標品と同じ保持時間のピークの画分を分取した。濃縮して酢酸メチルで抽出してエバポレーターで乾固すると230mgの白色固体が得られた。これをジエチルエーテルで再結晶すると無色の結晶216mg(回収率77.1%)が得られた。この結晶をHPLCで分析すると純度99.4%であった。結晶は、融点236~238℃(分解)、旋光度 $[\alpha]_D = -54^\circ$ (C=0.41、メタノール、23℃)であり、マスマスペクトル、UV、 $^1\text{H-NMR}$ スペクトルのデータは標品の分析値及び文献(J.Org.Chem., Vol.46, 1469(1981))記載の分析値と一致したことから、得られた結晶はバッカチンIIIであることが確認された。

#### 【0079】比較例1

実施例1同様にイチイ葉をメタノール、続いて酢酸メチルで抽出し、アルカリ、酸処理した油10g(10-デ

アセチルバッカチンIII 0.22%、バッカチンIII 0.024%、7-キシロシルタキソール0.23%、セファロマニン0.023%、タキシニン0.37%を含む。)を塩化メチレン50mL-トルエン50mLに溶解し、細孔径20Åのメソポーラスシリカゲル10g(豊田中央研究所製)と2時間、マグネチックスターラーを用いて200rpmで攪拌した。濾過し、吸着処理後のシリカゲルをメタノール50mLで2回抽出する操作(1時間メタノールと攪拌して濾過)を行い、回収されたメタノール溶液を濃縮すると、得られた脱着油はわずかに1.4gであった。この脱着油を分析してもタキサン化合物はなく、このシリカゲルにはタキサン化合物はほとんど吸着されていないことが分かった。この結果、20Åの細孔径では穴が小さく、タキサン化合物が入れないことが分かった。

#### 【0080】比較例2

比較例1で用いたのと同じ油100gを吸着、脱着の操作をしないで、実施例5と同様の精製処理を行った。その結果、39gの前処理油が(10-デアセチルバッカチンIII 0.56%、バッカチンIII 0.06%、7-キシロシルタキソール0.59%、セファロマニン0.059%、タキシニン0.94%)得られた。本例で得られた各タキサン化合物の多くは、その濃度が実施例5

の前処理油の濃度より小さいものであった。ここで得られた前処理油のうち15gをとり、実施例6で行ったのと同様の条件で分取液体クロマトグラフ装置による精製を行った。その結果、10-デアセチルバッカチンIIIとバッカチンIIIはクロマトグラムにおけるピークが重なってしまい、これらを分離することはできなかった。また、タキソールとセファロマニンもピークが一部重なって分離できなかった。10-デアセチルバッカチンIIとバッカチンIIIは別の溶出液組成:アセトニトリル/水/メタノール=20/60/20(容積比)で再精製すれば分離するが、タキソールとセファロマニンは溶出液組成を変えても分取液体クロマトグラフィーでは分離が難しいことが分かった。

#### 【0081】

【発明の効果】本発明の精製方法によれば、タキサン化合物を含有する混合物から吸着、溶出という操作の簡単な方法によりタキサン化合物含有成分を分離することで、精製操作を簡略化し、さらには精製時のタキサン化合物のロスを抑えたタキサン化合物の精製が可能になり、タキサン化合物を効率よく入手できるという効果が奏される。さらに、本発明の方法によれば、セファロマニンを容易に得ることができる。

---

フロントページの続き

Fターム(参考) 4C048 AA06 BB01 BC16 CC01 UU01  
XX03  
4H006 AA02 AB28 AB84 AD17 BA71  
BB11 BB12 BB14 BB16 BB21  
BD60